

VU Research Portal

Mysteries beyond the mycomembrane: insights into capsular a-glucan biogenesis

van de Weerd, R.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van de Weerd, R. (2016). *Mysteries beyond the mycomembrane: insights into capsular a-glucan biogenesis*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Sinds de ontdekking van *Mycobacterium tuberculosis*, de ziekteverwekker van tuberculose (TB), meer dan een eeuw geleden zijn er enorme inspanningen gedaan om TB terug te dringen en dit pathogeen te bestrijden; desondanks blijft TB echter een enorm wereldwijd volksgezondheidsprobleem. *M. tuberculosis* infecteert een derde van de wereldbevolking en ongeveer 5-10% van deze TB “patiënten” ontwikkelt actieve tuberculose. Behandeling van tuberculose wordt bemoeilijkt door het feit dat de bacillus ongevoelig is voor veel soorten antibiotica. Momenteel is de standaardbehandeling voor TB patiënten, bij niet-resistente *M. tuberculosis* stammen, een combinatie therapie met de eerstelijns TB middelen isoniazide, rifampin, pyrazinamide en ethambutol voor 4 maanden. Dit wordt gevolgd door een verdere behandeling met twee TB middelen gedurende 2 maanden. Hoewel deze zes maanden durende behandeling beschikbaar is, zorgt TB nog steeds wereldwijd voor ongeveer 1,5 miljoen doden per jaar. Daarom zijn innovatieve strategieën die doeltreffender TB kunnen bestrijden essentieel omdat onze huidige inspanningen deze ziekte te bestrijden tekortschieten. In dit verband zijn inzichten in de moleculaire mechanismen van de mycobacteriële cel envelop biogenese belangrijk voor het ontwerp van nieuwe TB drug therapieën omdat de cel envelop essentieel is voor het overleven, virulentie en pathogenese van *M. tuberculosis*. Uit intensief onderzoek van de afgelopen tientallen jaren blijkt dat de buitengewoon complexe cel envelop van *M. tuberculosis* een perifere polysaccharide kapsel laag bevat, die net als bij andere gekapselde bacteriën belangrijk kan zijn voor de bacteriële pathogenese. Daarom is dit kapsel een belangrijk target voor de ontwikkeling van immuno- en chemo-therapieën en de ontwikkeling van vaccins. Inderdaad, door de jaren heen zijn bij andere pathogenen soortgelijke strategieën gericht op bacteriële kapsel polysaccharides ontwikkeld. Vaccins op basis van kapsel polysaccharides van bacteriesoorten die dodelijke infecties bij de mens kunnen veroorzaken zoals: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* en *Streptococcus* groep B, zijn zeer effectief gebleken. Op dit moment zijn er echter beperkte gegevens beschikbaar over de kapsel polysaccharides van *M. tuberculosis*. Inzichten in de moleculaire mechanismen van de kapsel polysaccharide biosynthese zijn niet volledig en de polysaccharide bestanddelen zijn pas recent in detail gekarakteriseerd. In de afgelopen decennia bleek uit verschillende onderzoeken dat het kapsel van mycobacteriën uit drie glycopolymers bestaat, te weten α -glucan, arabinomannan en mannan, waarvan α -glucan de belangrijkste polysaccharide bestandsdeel vormt in *M. tuberculosis*. Hoewel kapsel α -glucan geassocieerd is met virulentie en immuun modulatie, ontbreken de inzichten over de exacte biosynthese routes, transport systemen, regulatie en de biologische functie van dit belangrijke glucopolymer. In dit werk, hebben we ons gericht op α -glucan en dit proefschrift beschrijft inzichten in verschillende ontbrekende facetten van het onderzoeksveld. Een van de meest beperkende factoren in het kapsel α -glucan onderzoek is het ontbreken van snelle α -glucan detectie technieken, die geschikt zijn voor verwerken van grote aantallen samples. Daarnaast ontbreken technieken die het mogelijk maken onbevooroordeeld genoom wijde mutant screenings op te zetten waarmee genen betrokken bij kapsel α -glucan biosynthese, transport en regulatie geïdentificeerd kunnen worden. In **hoofdstuk 2** beschrijven we nieuw ontwikkelde, op monoclonaal antilichaam (Mab) gebaseerde detectie technieken om deze beperking in het onderzoeksveld op te lossen en op deze manier het mycobacteriële kapsel polysaccharide-onderzoek te innoveren. Dit hoofdstuk beschrijft de epitoop karakterisatie van een Mab gericht tegen α -glucan en we beschrijven verschillende makkelijk uitvoerbare (semi-) kwantitatieve α -glucan detectie methodes. Met de ontwikkeling hiervan waren wij instaat genoom-brede screenings op te zetten door koppeling van de Mab-

gebaseerde detectie technieken met grootschalige transposon mutagenese in verschillende mycobacteriële species. Vanuit dit kader hebben wij verschillende interessante kapsel α -glucan mutanten geïdentificeerd waarvan een aantal in detail zijn onderzocht in dit werk; deze zijn beschreven in **hoofdstukken 4 en 5**. **Hoofdstuk 2** vormt de basis van dit proefschrift en de hierin beschreven technieken hebben de mogelijkheid gegeven verschillende aspecten te onderzoeken van kapsel α -glucan. In **hoofdstuk 3** is het onderzoek weergegeven naar het ophelderen van de biosynthese routes van α -glucan. Door intensieve genetische manipulatie van genen betrokken bij α -glucan biosynthese te combineren met de α -glucan kwantificatiemethodes, waren wij in staat om tot een volledig beeld te komen hoe intra- en extracellulaire α -glucan's worden gesynthetiseerd in mycobacteriën. Ons onderzoek laat zien dat twee individuele routes TreS-Pep2 en GlgC-GlgA verantwoordelijk zijn voor de productie van het disaccharide maltose-1-P. Maltose-1-P wordt dan als bouwsteen gebruikt om via de enzymen GlgE en GlgB het complete glucopolymer α -glucan te synthetiseren. Met deze inzichten in de biosynthese routes waren we als eerste ter wereld in staat om α -glucan negatieve mutanten te creëren waarmee we de rol van dit glucopolymer konden bestuderen bij experimentele infecties in muizen om inzicht te verkrijgen in de bijdrage van α -glucan aan virulentie. In dit hoofdstuk hebben we beschreven dat α -glucan inderdaad een belangrijke rol heeft in de virulentie van *M. tuberculosis*. In **hoofdstuk 4**, geven we een diepteanalyse van een groep van mutanten in het ABC transport locus *pst*, die alle werden opgepikt in de α -glucan Mab gebaseerde transposon screening. Het transport systeem Pst is belangrijk in de opname van anorganisch fosfaat en we laten zien dat deze mutanten het kapsel α -glucan massaal over produceren. In dit hoofdstuk beschrijven we dat anorganisch fosfaat stress een belangrijke trigger is voor het reguleren van kapsel α -glucan niveaus in mycobacteriën en onderzoeken we twee mogelijke stress response routes: het SigE regulon en de stringent response. We hebben ontdekt dat onder anorganische fosfaat stress de opregulatie van kapsel α -glucan afhankelijk is van transcriptiefactor SigE en niet van de stringent response. Onder een andere stress conditie, namelijk aminozuur stress, zorgt de stringent response wel voor de opregulatie van kapsel α -glucan productie. In dit hoofdstuk geven we ook een model hoe verschillende stress condities kunnen bijdragen aan een verhoogde kapsel α -glucan productie door deze twee stress response routes te activeren. In **hoofdstuk 5**, wordt een gedetailleerde studie weergegeven van een fascinerende transposon mutant, geïdentificeerd in de kapsel screen in *M. marinum*. Deze mutant heeft een transposon insertie in een gen van voorheen onbekende functie dat ortholoog is aan *M. tuberculosis* H37Rv *rv2179c*. Deze mutant in *M. marinum* is ernstig geattenuëerd *in vivo* in de zebravis. In dit hoofdstuk beschrijven we dat gen *rv2179c* codeert voor een eiwit van de superfamilie DEDDh exonucleases. We beschrijven dat dit exonuclease in staat is specifiek polyA RNA-nucleotiden te hydrolyseren. Dit suggereert dat dit enzym polyA staarten van mRNA transcripten kan hydrolyseren en daarmee mogelijk de stabiliteit van mRNA reguleert. Daarnaast geven we een diepgaande analyse van de enzym activiteit inclusief de wijze van interactie met substraat en de nucleotide specificiteit. Aangezien we hebben ontdekt dat dit exonuclease specifiek polyA RNA hydrolyserende activiteit bezit, hebben we dit enzym geannoteerd als RNase AS (Adenosine Specifiek). De bevindingen van dit hoofdstuk suggereren dat RNase AS, en daarmee haar specifieke rol in RNA polyA staart hydrolyse essentieel is voor mycobacteriën *in vivo*. Ten slotte worden in **hoofdstuk 6** de resultaten van de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift bediscussieerd in een bredere, coherente context. Samenvattend beschrijft dit proefschrift verschillende aspecten van het kapsel glucopolymer α -glucan en de nieuw verworven kennis vormt een platform voor verder onderzoek op het gebied van het kapsel polysaccharide α -glucan. Dit kan wellicht enerzijds leiden tot een nieuwe ingang om het transport systeem van α -glucan te

identificeren. Anderzijds kan het wellicht een startpunt vormen voor de ontwikkeling van nieuwe TB regimes, gericht tegen α -glucan. Met dit werk hebben we nieuwe inzichten gekregen in de mycobacteriële kapsel polysaccharides die mogelijk bijdragen aan innovatieve strategieën om de enorme uitdaging van de TB pandemie aan te pakken.